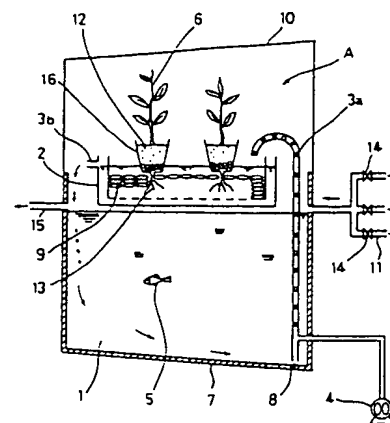


**(54) TESTING METHOD FOR WASTE WATER**

(11) 62-249059 (A) (43) 30.10.1987 (19) JP  
 (21) Appl. No. 61-92531 (22) 22.4.1986  
 (71) TAISEI CORP (72) KAZUYUKI YAMAZAKI(2)  
 (51) Int. Cl. G01N33/18, C02F3/32

**PURPOSE:** To enable an overall test in terms of whether waste water is harmful or harmless to living bodies by providing means for supplying in-tank water from one to the other to a fish breeding tank and plant culture tank.

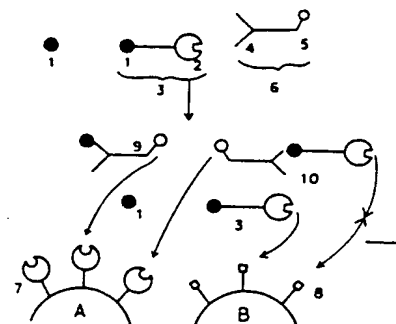
**CONSTITUTION:** Objective fishes 5 are bred in the fish breeding tank 1 and objective plant 6 is cultured in the plant culture tank 2. The residues of feed, excrements, etc. by the breeding of the fishes 5 are supplied by the means 3a for supplying the in-tank water to the plant culture tank 2 where the residues, etc., are filtered and decomposed and are at the same time used to grow the plant 6 as the nutrient thereto. The water cleaned thereby is supplied by the means 3b for supplying the in-tank water into the fish breeding tank 1. The waste water or treated water is introduced in this state into the fish breeding tank 1 through an introducing pipe 11 and the influence thereof on the fishes 5 and the plant 6 is visually observed, by which the generation of abnormality in the objective treatment installation, etc., is checked.

**(54) IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT METHOD**

(11) 62-249060 (A) (43) 30.10.1987 (19) JP  
 (21) Appl. No. 61-93986 (22) 22.4.1986  
 (71) KONISHIROKU PHOTO IND CO LTD (72) SATORU KAWAKATSU(3)  
 (51) Int. Cl. G01N33/543

**PURPOSE:** To measure wide measuring objects from low mol.wt. materials to high mol.wt. materials with high sensitivity by immobilizing a material which modulates the signal arising from a labeling material by conjugating specifically with the labeling material to a carrier.

**CONSTITUTION:** A bioactive material 5 or material 7 which conjugates specifically with the bioactive material is immobilized to the immobilizing carrier to form immobilized matter A. A material 8 which modulates the signal arising from the labeling material by conjugating specifically with the labeling material is immobilized thereto to form immobilized matter B. The conjugation reaction in the liquid phase arises preferentially when the immobilized matters A and B, the specific component 1 in a liquid sample, the labeling material 3 and the conjugate 6 of the material 4 which conjugates specifically with the specific component and the bioactive material 5 are made to co-exist in an aq. soln. The unreacted labeling material 3 existing in the liquid phase and the resultant product 9 of the conjugation reaction of the specific component 1 and the conjugate 6 are respectively separated by the conjugation reaction with the immobilized matters B, A as a result of the conjugation reaction of the liquid phase system. The concn. of the specific component in the unknown liquid sample is known from the signal intensity of the entire part of the labeling material.

**(54) ANALYSIS OF SPECIFIC COMPONENT**

(11) 62-249061 (A) (43) 30.10.1987 (19) JP  
 (21) Appl. No. 61-91297 (22) 22.4.1986  
 (71) KONISHIROKU PHOTO IND CO LTD (72) TSUKASA ITO(3)  
 (51) Int. Cl. G01N33/543, C12Q1/00

**PURPOSE:** To obtain a stable calibration curve in a concn. range of a specific component and to permit simple analysis with versatility by selecting the immobilization amts. of an antigen or antibody and enzyme inhibitor to suitable amts.

**CONSTITUTION:** The antigen or antibody and enzyme inhibitor are immobilized to a porous reaction layer and the immobilization amts. thereof are so selected that 3~70%, more preferably 10~25% of the total amt. of a labeling material conjugates with the antigen or antibody and that 0.1~10%, more preferably 0.1~5% thereof attains the free state without conjugating with the antigen or antibody and enzyme inhibitor at the point of the time when the prescribed operation for analysis by using a sample contg. substantially no specific components ends. The above-mentioned immobilized matter as well as the labeling material conjugated with the measuring object, i.e., specific component and enzyme and the fluid sample are altogether made to co-exist in an aq. soln. and the enzyme activity is measured in the case of analyzing the specific component in the fluid sample. The specific component is thus analyzed.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑬ 公開特許公報(A)

昭62-249061

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月30日

G 01 N 33/543  
C 12 Q 1/00

C-7906-2G  
8412-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全14頁)

⑭ 発明の名称 特定成分の分析方法

⑯ 特 願 昭61-91297

⑰ 出 願 昭61(1986)4月22日

⑱ 発 明 者 伊 藤 可 日野市さくら町1番地 小西六写真工業株式会社内  
⑱ 発 明 者 川 勝 哲 日野市さくら町1番地 小西六写真工業株式会社内  
⑱ 発 明 者 大 西 明 日野市さくら町1番地 小西六写真工業株式会社内  
⑱ 発 明 者 竹 腰 匡 代 日野市さくら町1番地 小西六写真工業株式会社内  
⑲ 出 願 人 小西六写真工業株式会 東京都新宿区西新宿1丁目26番2号  
社  
⑳ 代 理 人 弁理士 中 本 宏 外2名

明 細 書

3 発明の詳細な説明

1. 発明の名称

特定成分の分析方法

2. 特許請求の範囲

1. 液体試料中の特定成分を分析する場合に、該特定成分と免疫学的に結合する抗原又は抗体と酵素阻害剤とを固定部位を分けて担体に固定化した固定化物、及び測定対象である特定成分と酵素とが結合した標識物を用い、該液体試料と一緒に水溶液中に共存させた後、該酵素活性を測定することにより該特定成分を分析する方法において、該固定化物として、該特定成分を実質上含有しない液体試料を用いて所定の分析操作を終了した時点で、該標識物の総量のうち3〜70%が該抗原又は抗体と結合し、かつ0.1〜1.0%が該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤に結合していないように、該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の固定化量を設定した固定化物を用いることを特徴とする特定成分の分析方法。

〔産業上の利用分野〕

本発明は、液体試料中の微量成分の分析方法に係り、特に免疫学的測定法による生物学的液体試料中の特定微量成分を分析する方法に関する。

〔従来の技術〕

生物学的液体試料中に微量含有される物質を検出する方法として、各種分析法の開発がなされてきた。その分析法は、主として免疫反応をその原理とするものである。上記原理を用いる測定法として、種々のものが開発されてきたが、最も精度の高いものとして、免疫測定法が知られている。

免疫測定法は、1958年、ベルソン(Berson)とイアロウ(Young)が、放射能ヨードで標識した、ウシインシュリンと糖尿病患者血清中の抗インシュリン抗体を用いて、血清中のインシュリンを測定することに成功して以来、放射免疫測定法が広く用いられている。

これ以後標識化合物として、放射性同位元素以外のものが種々開発がなされてきた。他の標識化合物としては例えば、酵素、酵素基質、補酵素、酵素阻害物質、バクテリオファージ、遺伝反応体、金属及び有機金属の錯体、有機補欠分子族、化学発光性反応体、及び蛍光性分子等が挙げられる。

上記免疫測定法に関する技術上の重要な問題の1つとして、結合を起した物質(以下、Bと略記する)と起さなかつた物質(以下、Fと略記する)の分離(以下B/F分離と略記する)がある。

該分離操作は煩雑かつ時間のかかるものであるため、これを改良するために第1抗体固相法、2抗体法などが開発されたが、これらの方法を用いても該分離操作は分析者にとって依然大きな負担となつている。

また該分離操作を必要としない方法としてエミット(米国サイバー社登録商標)、エンザイムチャネリングイムノアッセイ、テトラザイム

は極めて変動しやすく、該抗体や阻害剤等の量のわずかな変化により測定が不可能になる。抗原、抗体、酵素などの生物由来物質は一般に純品が入手不可能で、粗精製品はロットによりその純度が大きく変動する上に、こうした生物由来物質は保存中においてしばしば活性が変化するので、前述の検査量の不安定性は測定を行う際大きな障害となる。

本発明の目的は、前述の問題点を解消し、操作が簡単でかつ安定した検査量を与え、汎用性のある分析方法を提供することにある。

(問題点を解決するための手続)

本発明を概説すれば、本発明は流体試料中の特定成分を分析する方法に関する発明であつて、流体試料中の特定成分を分析する場合に、該特定成分と免疫学的に結合する抗原又は抗体と酵素阻害剤とを測定部位を分けて担体に固定化した固定化物、及び測定対象である特定成分と酵素とが結合した標識物を用い、該流体試料と一緒に水溶液中に共存させた後、該酵素活性を開

(米国アボット社登録商標)などのいわゆるホモジニアスイムノアッセイが開発されたがこれらの方法も、測定対象が限られていたり、感度が不充分であるなどの欠点を有していて、広く一般の測定対象に汎用されるには至っていない。

他に、標識化合物を用いない測定法として、レーザーネフエロメトリー、ラテックス近接外比濁法などが開発されているが、これらの方法は極めて高価な専用機械を必要とし、用途も限られている。

[発明が解決しようとする問題点]

特開昭60-67857号公報には、「抗原又は抗体と、酵素又は酵素阻害もしくは活性化物質とが、担体に各々の固定相が分離されて固定されている、抗原又は抗体と酵素阻害もしくは活性化物質の固定化物」を用いる新しい測定法が開発されている。この方法は、B/F分離を人為的に行う必要が無い点で注目される。

しかし、この測定法は非常に複雑な競合反応の結果として測定を行つているため、その検査

定することにより該特定成分を分析する方法において、該固定化物として、該特定成分を実質上含有しない流体試料を用いて所定の分析操作を終了した時点で、該標識物の総量のうち3〜70%が該抗原又は抗体と結合し、かつ1〜10%が該抗原又は抗体、及び酵素阻害剤に結合していないように、該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の固定化量を設定した固定化物を用いることを特徴とする。

本発明において、流体試料としては、あらゆる形態の溶液、コロイド溶液が使用しうるが、好ましくは生物由来の流体試料例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、唾液、尿、羊水、乳、胆汁、肉汁等が挙げられる。

本発明により測定しうる流体試料中での特定成分Aとは、その存在又は、その流体試料中での量が測定され、その特定成分Aに特異的に結合する物質が待うる物質又は物質群である。すなわち、ポリペプチド、タンパク質、複合タンパク質、多糖類、脂質、複合脂質、核酸、ホル

モン類、ビタミン類、薬剤、抗生物質、農薬等が挙げられる。具体的には、下記の物質又は物質群を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

(タンパク質、複合タンパク質)

プレアルブミン、アルブミン、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン、 $\alpha_1$ -糖タンパク質、トランスコルチン、 $\alpha_1$ -アンチキモトリプシン、 $\alpha_1$ -リボタンパク質、チロキシン結合グロブリン、セルロブラスミン、Zn- $\alpha_2$ -糖タンパク質、O $\alpha$ -グロブリン、インター- $\alpha$ -トリプシンインヒビター、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、 $\alpha_2$ -H $\beta$ -糖タンパク質、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、ハプトグロビン、 $\alpha_2$ -リボタンパク質、ヘモペキシン、トランスフェリン、 $\beta$ -リボタンパク質、 $\beta_2$ -糖タンパク質、 $\beta_2$ -マクログロブリン、C-反応性タンパク質、ミオグロビン、エリスロポイエチン、免疫グロブリン(IgG, IgM, IgA, IgD, IgE)、補体系成分(C $_1$ , C $_2$ , C $_3$ , C $_4$ , C $_5$ , C $_6$ , C $_7$ , C $_8$ , C $_9$ 等)、フ

レチン、ドーパミン、セロトニン、ソマトスタチン、サイロキシン(T $_4$ )、トリヨードサイロニン(T $_3$ )、ガストリン、コルチゾール、アルドステロン、カテコラミン、エストロゲン、プロゲステロン、テストステロン、胎盤性ゴナドトロピン、胎盤性ラクトゲン、下垂体ホルモン放出因子(TRH, FSH-RH, CRH, LH-RH等)等。

(ビタミン類)

ビオチン、チアミン、ビタミンA、ビタミンB $_2$ 、ビタミンB $_6$ 、ビタミンB $_{12}$ 、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンK、葉酸等。

(腫瘍マーカー)

$\alpha$ -フェトプロテイン、癌胎児性抗原、フェリチン、ポリアミン、癌胎児抗原、塩基性フェトプロテイン、M-タンパク、前立腺酸性ホスファターゼ、糖鎖性抗原(CA19-9, CA125等)、ガングリオサイズ

(各種の薬剤及び代謝産物)

ベンゾイルエタゴニン、コカイン、コデイン、デキストロメトローファン、ヘロイン、リセルグ

イブリンノーゲン、ヘモグロビン、グリコヘモグロビン、血液凝固因子、HB $\theta$ 抗原、HB $\theta$ 抗体、酵素(例えば、酸性ホスファターゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アルカリ性ホスファターゼアイソエンザイム、 $\alpha$ -アミラーゼ、アミラーゼアイソエンザイム、アルドラーゼ、コリンエステラーゼ、クレアチンホスホキナーゼ、クレアチンホスホキナーゼアイソエンザイム、トランスアミナーゼ(GOT, GPT)、乳酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素アイソエンザイム、 $\gamma$ -GTP、リパーゼ、モノアミンオキシダーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ、ブドウ糖6リン酸脱水素酵素等)等。

(ホルモン及びホルモン様物質)

卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体刺激ホルモン(LH)、成長ホルモン(GH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、メラニン刺激ホルモン(MSH)、パソプレッシン、オキシトシン、インシュリン、グルカゴン、アンギオテンシンI及びII、プロラクチン、セク

酸、モルヒネ、キニジン、キニーネ、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、トブラマイシン、アクトノマイセチン、カロマイシン、クロラムフェニコール、クロロマイセチン、クロルテトラサイクリン、エритроマイシン、オキシテトラサイクリン、ペニシリン、ポリミキシンB、テラマイシン、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、ジフェニルヒダントイン、エトスクシミド、フェノバルビタール、プリミドン、セコバルビタール、アセタミノフェン、アミトリプチン、カルバマゼピン、ジゴキシン、ジソピラミド、リドカイン、メソトレキセート、N-アセチルプロカイナミド、フェニトイン、プロカイナミド、プロプラノロール、チオファイリン、カナビノール、テトラヒドロカナビノール、コリン抑制薬、抗ヒスタミン剤、アトロピン、ブチロフェノン、カフェイン、クロロプロマジン、エピネフリン、グリセオフルビン、イミプラミン、L-ドーパ、メペリジン、メプロバメート、メタドン、ナル

セイン、ノルトリブチリン、オキサゼバム、バベリン、プロスタグランジン、テグレートール、バルブロン酸等及びこれらの代謝産物。

(微生物表面マーカー)

バクテリア抗原、菌膜抗原、寄生虫抗原、ウイルス抗原。

(色素)

ハロゲン化ビフェニル、リン酸エステル類、チオホスファート類、及びこれらの代謝産物。

(その他)

血液凝固物質、カルジオリビン、アレルギー等。

本発明で用いる「流体試料中の特定成分と免疫学的に結合する抗原又は抗体」とは、該特定成分が抗体であれば、該抗体が特異的に結合する抗原を意味し、該特定成分が抗原であれば、該抗原に対する抗体を意味する。

後者の場合、使用する抗体は、その由来を特に限定されるものではなく、哺乳動物等に抗原を投与、免疫して得られる抗血清、腹水液をそのままか、あるいは従来公知の方法である(右

田俊介編「免疫化学」中山書店第74～88頁参照) 硫酸ナトリウム沈殿法、硫酸アンモニウム沈殿法、セフアデックスゲルによるゲル濾過法、イオン交換セルロースクロマトグラフィー法、電気泳動法等で精製して用いることができる。

あるいは抗原で感作した哺乳動物等(例えばマウス)脾臓細胞と骨髓腫細胞(ミエローマ)とから雑種細胞(ハイブリドマ)を得てモノクローナル抗体をつくつても良い。

また、これらの抗体はIgG、IgM、IgA、IgD、IgE各分画を用いることができ、あるいはこれらの抗体を酵素処理してFab、Fab'又はF(ab')<sub>2</sub>といった活性抗体フラグメントにして使用してもよい。更にこれらの抗体は単一で使用しても、複数の抗体を組合せ使用してもよい。

本発明において、標識として使用しうる酵素としては、酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、脱脂酵素、異性化酵素、合成酵素のうち任意の酵素が使用できるが、代表的な具体例と

しては、下記に示される酵素を挙げるることができる。

EC. 1.1.1.1	アルコールデヒドロゲナーゼ	EC. 1.1.3.-	L-α-グリセロリン酸オキシダーゼ
1.1.1.6	グリセロールデヒドロゲナーゼ	1.2.1.1	ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ
1.1.1.8	グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(NAD <sup>+</sup> )	1.2.1.2	グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ
1.1.1.27	乳酸デヒドロゲナーゼ	1.2.3.2	キサンテンオキシダーゼ
1.1.1.37	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	1.2.3.3	ビルビン酸オキシダーゼ
1.1.1.40	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(NADP <sup>+</sup> )	1.2.3.4	オキサール酸オキシダーゼ
1.1.1.47	グルコースデヒドロゲナーゼ	1.3.3.-	アシルCoAオキシダーゼ
1.1.1.48	ガラクトースデヒドロゲナーゼ	1.4.1.1	アラニンデヒドロゲナーゼ
1.1.1.49	グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	1.4.1.3	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(NAD(P) <sup>+</sup> )
1.1.2.3	乳酸デヒドロゲナーゼ(チトクローム)	1.4.1.4	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(NADP <sup>+</sup> )
1.1.3.1	グリコール酸オキシダーゼ	1.4.3.2	L-アミノ酸オキシダーゼ
1.1.3.2	乳酸オキシダーゼ	1.4.3.3	D-アミノ酸オキシダーゼ
1.1.3.4	グルコースオキシダーゼ	1.4.3.4	アミノオキシダーゼ(フラビン含有)
1.1.3.6	コレステロールオキシダーゼ	1.4.3.6	アミノオキシダーゼ(銅含有)
1.1.3.9	ガラクトースオキシダーゼ	1.5.1.3	チトラヒドロキソ酸デヒドロゲナーゼ
1.1.3.17	コリンオキシダーゼ	1.5.3.1	サルコシンオキシダーゼ
		1.6.4.2	グルタチオンレダクターゼ(NAD(P)H)

EC. 1.6.4.3 ジヒドロリボアミドレダクターゼ  
(NAD<sup>+</sup>) (シアホラーゼ)

1.7.3.3 尿酸オキシダーゼ

1.1.1.16 カタラーゼ

1.1.1.17 ペルオキシダーゼ

1.1.3.1.24 乳酸 2 - モノオキシゲナーゼ

1.1.3.1.25 レニラ ルシフェリン - 2 - モノオキシゲナーゼ

1.1.3.1.26 シブリジナ ルシフェリン - 2 - モノオキシゲナーゼ

1.1.3.1.27 フォタヌス ルシフェリン - 4 - モノオキシゲナーゼ (ATP 加水分解)

1.1.4.1.32 4 - ヒドロキシ安息香酸 3 - モノオキシゲナーゼ

1.1.4.9.21 ラチア ルシフェリンモノオキシゲナーゼ

2.1.3.1 メタルマロニル CoA カルボキシトランスフェラーゼ

2.3.2.2  $\gamma$  - グルタミルトランスフェラーゼ

2.7.1.1 ヘキソキナーゼ

EC. 3.2.1.20  $\alpha$  - D - グルコシダーゼ

3.2.1.21  $\beta$  - D - グルコシダーゼ

3.2.1.23  $\beta$  - D - ガラクトシダーゼ

3.2.1.35 ヒアルロノグルコサミニダーゼ

3.4.1.1.6 アルギニンアミノペプチダーゼ

3.4.2.2.4 プロメライン

3.5.1.1 アスバラギナーゼ

3.5.1.5 ウレアーゼ

3.5.4.2 アデニンデアミナーゼ

3.5.4.4 アデノシンデアミナーゼ

3.5.4.6 AMP デアミナーゼ

4.1.1.3 オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ

4.1.1.4.1 プロピオニル - CoA カルボキシラーゼ

4.1.2.1.3 フルクトースニリン酸アルドラーゼ

4.2.1.2.0 トリプトファンシンセターゼ

5.3.1.9 グルコースリン酸イソメラーゼ

6.3.4.1.4 ビオチンカルボキシラーゼ

6.4.1.1 ビルビン酸カルボキシラーゼ

6.4.1.2 アセチル CoA カルボキシラーゼ

6.4.1.3 プロピオニル - CoA カルボキシラーゼ

EC. 2.7.1.2 グルコキナーゼ

2.7.1.15 リボキナーゼ

2.7.1.28 トリオキナーゼ

2.7.1.4.0 ビルビン酸キナーゼ

2.7.5.1 ホスホグルコムターゼ

3.1.1.3 リパーゼ

3.1.1.4 ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>

3.1.1.7 アセチルコリンエステラーゼ

3.1.1.8 コリンエステラーゼ

3.1.3.1 アルカリホスファターゼ

3.1.3.2 酸ホスファターゼ

3.1.3.9 グルコース - 6 - ホスファターゼ

3.1.3.1.1 フルクトースジホスファターゼ

3.1.3.2.1  $\alpha$  - グルセロールホスファターゼ

3.1.4.1 ホスホジエステラーゼ I

3.1.4.3 ホスホリパーゼ C

3.2.1.1  $\alpha$  - アミラーゼ

3.2.1.2  $\beta$  - アミラーゼ

3.2.1.1.7 ライソザイム

3.2.1.1.8 ノイラミニダーゼ

(ATP - 加水分解)

EC. 4.4.1.4 メタルクロトニル - CoA カルボキシラーゼ

4.4.1.5 グラノイル - CoA カルボキシラーゼ

等

本発明で用いる標識物とは、酵素と測定対象である特定成分とを、既述の本発明で使用する抗原又は抗体との結合能力を保持したまま、かつ該酵素の信号を発する能力を保持したまま、化学的結合手段等で、直接又は間接的に結合した物質を意味する。

実際には、該特定成分と該酵素を、当業者間で一般に知られている公知の試薬と公知の方法を用いて容易に製造することができる。更に詳しく述べると、石川栄治、河合 忠、宮井 潔編「酵素免疫測定法 (第2版)」(医学書院、1982年刊)及び日本臨床病理学会編「臨床病理」臨時増刊特集第53号「臨床検査のためのイムノアッセイ——技術と応用——」(臨床病理刊行会、1983年刊)等に記載された種

々の方法を用いることができる。

以下に具体例を挙げて説明するが、これは本発明を限定するものではない。

(1) 該特定成分及び該酵素を、下記のような架橋剤と反応させる方法

- ① 2, 4, 6 - トリクロロ - 1, 3, 5 - トリアジン
- ② 4, 4' - ジフルオロ - 3, 3' - ジニトロジフェニルホルン
- ③ トルエン - 2, 4 - ジイソシアネート
- ④ N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド
- ⑤ 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド
- ⑥ ビスジアゾ - 0 - ジアニシジン
- ⑦ グルタルアルデヒド など

(2) 該特定成分と該酵素のうち少なくともどちらかが糖鎖を有している時、該糖鎖を過ヨウ素酸で処理し、生じたアルデヒド基を結合すべき相手物質のアミノ基と反応させる方法。  
(必要に応じて、過ヨウ素酸処理の前の不飽和

ト

- ⑧ 2 - イミノチオラン
- ⑨ 3 - (2' - ジチオビリジル) プロピオン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル
- ⑩ メチル 3 - (4' - ジチオビリジル) プロピオンイミデート など

また、前述のマレイミド試薬としては次のような例が挙げられる。

- ① N, N' - 0 - フェニレンジマレイミド
- ② N, N' - p - フェニレンジマレイミド
- ③ N, N' - m - フェニレンジマレイミド
- ④ N, N' - オキシジメチレンジマレイミド
- ⑤ N - スクシンイミジル - N - マレイミドアセテート
- ⑥ N - スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミド) ブタレート
- ⑦ N - スクシンイミジル - 5 - (N - マレイミド) ヘプタノエート
- ⑧ N - スクシンイミジル - 6 - (N - マレイミド) ヘキサノエート

な結合の形成を阻止するため 1 - フルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン等で該特定成分若しくは該酵素を前処理しておくか過ヨウ素酸処理反応の pH を 4 ~ 5 に制御する、あるいは該特定成分と該酵素間で形成されたシッフ塩基による結合を水酸化ホウ素ナトリウムやエタノールアミン等で処理し安定化する、といった処置をとつてもよい)

(3) 該特定成分及び該酵素がチオール基を有しているか、あるいは還元等によりチオール基を生ずる、あるいは適当な化合物で処理することによりチオール基を導入できる場合、マレイミド試薬として知られている種々の架橋剤と該チオール基と反応させる方法。

(ここでチオール基を導入する化合物としては次のような例が挙げられる)

- ① 無水 8 - アセチルメルカプトスクシン酸
- ② メチル - 3 - メルカプトプロピオンイミデート
- ③ メチル - 4 - メルカプトブチルイミデート

- ④ N - スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサノ - 1 - カルボキシレート
- ⑤ N - スクシンイミジル - m - (N - マレイミド) ベンゾエート
- ⑥ N - スクシンイミジル - p - (N - マレイミドフェニル) - 4 - ブタレート
- ⑦ N - スルホスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサノ - 1 - カルボキシレート
- ⑧ N - スルホスクシンイミジル - m - (N - マレイミド) ベンゾエート
- ⑨ N - スルホスクシンイミジル - p - (N - マレイミドフェニル) - 4 - ブタレート
- ⑩ N - スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) ベンゼン - 1 - カルボキシレート など)

(4) 該特定成分又は、該酵素にビリジール・ジスルフィド基を導入し、結合すべき相手化合物に導入した、あるいは元々存在するチオール

基と反応させる方法。

(ピリジル・ジスルフィド基の導入は3-(2'-ジチオピリジル)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルやメチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデートなどを処理すれば良い。またチオール基の導入は(3)項で述べた方法などが利用できる)

- (6) 該特定成分及び該酵素がチオール基を有しているか、あるいは還元等によりチオール基を生ずる、あるいは適当な化合物で処理することによりチオール基を導入できる場合、その片方の物質のチオール基をピリジル・ジスルフィド基に変換し、結合すべき相手物質のチオール基と反応させる方法。

(チオール基のピリジル・ジスルフィド基への変換は、4,4'-ジチオジピリジンなどにより行うことができる)

- (6) 該特定成分及び該酵素に、存在する又は導入した、アミノ基又はチオール基と、p-ベ

ンゾキノリンを反応させる方法。

- (7) モノワード酢酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを、該特定成分及び該酵素に、存在する又は導入した、チオール基に反応させる方法。

- (8) 該特定成分に対する抗体、該酵素に対する抗体、及び前2者の抗体に共通に特異結合する抗体を反応させる方法。

- (9) 該特定成分・該酵素の片方をアビジンと残りをビオチンと結合しておき、両者をビオチン・アビジン結合により結合させる方法。

本発明に使用しうる酵素阻害剤としてはジャーナル オブ ジ アメリカン ケミカル ソサイエティ (J. Am. Chem. Soc) 第80巻、第456頁 (1958年)；同第82巻、第596頁 (1960年)；アカウンツ オブ ケミカル リサーチ (Acc. Chem. Res) 第9巻315頁 (1976年)；サイエンス (Science) 第185巻320頁 (1974年)；化学工業 1985第21頁 (1985年) などに記載さ

れた、若しくは引用された酵素阻害剤などが好ましく用いられ、また次に開示された阻害剤も好ましく用いられる。

#### 酵素阻害物質の例

フィノステグミン

メチオニン スルホキシミン

ワイルドファイア (wildfire) 毒素

ブルーデキストラン

o-ジアニシジン-セルロース

o-ジアニシジン-デキストラン

2-プロピニルアミン

2-クロロアルルアミン

フェニルグリシン

p-ニトロフェニルグリシン

アミノアセトニトリル

2-アミノ-3-ヒドロキシプロピル-1,5'-カルボキシ-3'-アミノ-1'-プロベニル-1エーテル

L-2-アミノ-4-メトキシ-トランス-3-ブテン酸

エタノールアミン o-サルフェート

アルビジン

アザセリン

ジアゾオキソノルロイシン

ジアゾオキソノアノルバリン

$\Delta^3$ -7-アミノセファロスボリン酸

ミモシン

2-アミノ-4-ペンテン酸

2-アミノ-4-クロロ-4-ペンテン酸

3,3-ジクロロアラニン

3,3,3-トリクロロアラニン

D-シクロセリン

2-ヒドロキシル-3-ブテン酸

NN-トリメチル-2-プロピニルアミン

$\beta$ -アミノプロピオニトリル

2-ブロモエチルアミン

3-デシノイル-N-アセチルシステアミン

2,5-デカジエノイル-N-アセチルシステアミン

$\beta$ -クロロ-L-アラニン

L-セリン-o-サルフェート

$\beta$ -フルオロアラニン

L-ビニルグリシン

D-ビニルグリシン

プロパルギルグリシン

ガバクリン

5-ニトロ-L-ノルバリン

N-ベンジル-N-メチル-2-プロピニルアミン

3-ジメチルアミノ-1-プロピン

グリセロール

ジイソプロピルホスホロフルオライド

フェニルメタンスルホニルフルオライド

クラブラン酸

アロプリノール

ブチルチン

ヨード酢酸

ヨードアセトアミド

ベスタテン

ビリドキサルリン酸

ヒドラジンとその誘導体

ニトロフランとその誘導体

ニトロベンゼンとその誘導体

プリン誘導体

キレート化剤

重金属イオン

水銀化合物

等

また、酸酢素に対する抗体で、酸酢素に結合することによりその活性を阻害するものも、好ましく用いることができる。

本発明に用いられる担体は、例えば従来免疫分析に用いられてきたものであれば特に制限を受けず、ポリステレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート等の各種合成樹脂製のシート、ボール、プレート、チューブ、ビーズ、あるいは戸紙などがその例として挙げられる。

また、本発明の効果を十分に発揮するためには担体の表面積が充分大きいことが好ましく、サイズ1~350 $\mu$ mの粒状体や繊維状の担体が特に好ましい例として挙げられる。

特に、こうした粒状体や繊維状の担体を用い

る場合、該抗原又は抗体のみを固定化した担体と、酸酢素阻害剤のみを固定化した担体、更に必要に応じてこれらの物質を固定化していない担体を自由な量で混合して用いることができ、その結果1アッセイに用いる担体中の各成分の固定化量を任意に定めることができ、極めて好ましい態様となる。

該粒状体の材料としては、例えばケイ<sup>酸化</sup>土、二酸化チタン、硫酸バリウム、酸化亜鉛、<sup>酸化鉛</sup>、微細晶セルロース、ケイ砂、ガラス、シリカゲル、架橋デキストラン、架橋ポリアクリルアミド、アガロース、架橋アガロース、キチン、キトサン、各種合成樹脂(ポリステレン等)などの他、次のような反応性基を持つ化合物から成る自己重合粒子が挙げられる。

例示化合物

(1) ポリ(ステレン-コ-グリシジルメタクリレート)〔90/10〕。

(2) ポリ(ステレン-コ-メチルアクリレート-コ-グリシジルメタクリレート)〔80/

15/5〕。

(3) ポリ(ステレン-コ- $\alpha$ -ブチルメタクリレート-コ-グリシジルメタクリレート)〔75/15/10〕。

(4) ポリ(ステレン-コ-ビニルベンジルクロライド-コ-グリシジルメタクリレート)〔80/10/10〕。

(5) ポリ(ステレン-コ-ジビニルベンゼン-コ-グリシジルアクリレート)〔90/2/8〕。

(6) ポリ( $\beta$ -ビニルトルエン-コ-グリシジルメタクリレート)〔90/10〕。

(7) ポリ(メタクリレート-コ-グリシジルメタクリレート)〔80/20〕。

(8) ポリ(ステレン-コ-N,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート)〔95/5〕。

(9) ポリ(ステレン-コ-アリジギルエチルメタクリレート)〔95/5〕。

(10) ポリ(ステレン-コ-メチルアクリレート-コ-アクロレイン)〔90/5/5〕。

(11) ポリ(ステレン-コ-アクリルアミド)

- [95/5]。
- 02 ポリ(スチレン-コ-ビニルチオール)  
[95/5]。
- 03 ポリ(スチレン-コ-メチロール化アクリルアミド)[95/5]。
- 04 ポリ(スチレン-コ-セ-ブチルアクリレート-グリシジルメタクリレート)[90/5/5]。
- 05 ポリ(スチレン-コ-ビニルイソシアネート)[95/5]。
- 06 ポリ(メチルアクリレート-コ-スチレン-コ-N-メチロールアクリルアミド)[50/55/15]。
- 07 ポリ(スチレン-コ-グリシジルメタクリレート-コ-N,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート)[90/5/5]。
- 08 ポリ(スチレン-コ-メタクリル酸-コ-アクリルアミド)[95/2/3]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-N-メチロールアクリルアミド-コ-アクリル酸メトキシエチル  
チレン-コ-ビニルスルホニルエチルメタクリレート)[85/10/5]。
- 07 ポリ(スチレン-コ-N,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート)[90/10]。
- 08 ポリ(スチレン-コ-アクリル酸)[97/3]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-アクリルアミド)[97/3]。
- 09 ポリ(p-ビニルトルエン-コ-セ-ブチルアクリレート)[95/5]。
- 09 ポリ(メチルアクリレート-コ-メタクリルアミド)[95/5]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-N-メチロールアクリルアミド)[95/5]。
- 09 ポリ(p-ビニルベンジルクロライド-コ-N-メチロールアクリルアミド)[96/4]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-イタコン酸)[98/2]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-セ-ブチルアクリレート)[92/8]。
- [90/5/5]。
- 09 ポリ(p-ビニルトルエン-コ-N-メチロールアクリルアミド-コ-アクリル酸)[90/8/2]。
- 09 ポリ(メチルメタクリレート-コ-グリシジルメタクリレート-コ-セ-ブチルアクリレート)[80/10/10]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-p-ビニルベンジルクロライド-コ-アクリル酸-コ-アクリル酸ウレイドエチル)[75/10/5/10]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-メタクロレイン-コ-α-ヒドロキシエチルメタクリレート)[90/5/5]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-アクロレイン-コ-アセトアセトキシエチルメタクリレート)[85/5/10]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-N,N-ジメチルアミノエチルアクリレート-コ-ビニルスルホニルエチルメタクリレート)[90/5/5]。
- 09 ポリ(p-ビニルトルエン-コ-アミノスチレン-コ-アクリル酸-コ-アクリル酸)  
[50/65/5]。
- 09 ポリ(メチルメタクリレート-コ-スチレン-コ-2-ヒドロキシエチルメタクリレート)[25/70/5]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-ビニルスルホニルエチルアクリレート)[80/20]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-N,N-ジメチルアミノエチルアクリレート)[90/10]。
- 09 ポリ(スチレン-メチルアクリレート-コ-アセトアセトキシエチルアクリレート)[90/5/5]。
- 09 ポリ(スチレン-コ-メタクリル酸)[95/5]。

各例示化合物の後の括弧内は重合反応に用いた単量体の重量比を示す。

あるいは、これらの粒子数値を混合して用いることもできる。

また、本発明の多孔質反応層に用いる繊維としては、パルプ(粉末紙など)、綿、麻、絹、

羊毛、キチン、キトサン、セルロースエステル、ビスコースレーヨン、銅アンモニアレーヨン、ポリアミド（6-ナイロン、6,6-ナイロン、6,10-ナイロンなど）、ポリエステル（ポリエチレンテレフタレートなど）、ポリオレフィン（ポリプロピレン、ビニロンなど）、ガラス繊維、石棉など。植物性・動物性・鉱物性・合成・半合成・再生繊維を用いることができ、あるいはこれらを混合して用いても良い。あるいは別の態様としては吸水性の洋紙、和紙、戸紙、プラスチックポリマー、あるいはガラス繊維、動物性繊維（石棉など）、植物性繊維（木綿、麻、パルプなど）、動物性繊維（羊毛、絹など）、合成繊維（各種ナイロン、ビニロン、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレンなど）、再生繊維（レーヨン、セルロースエステルなど）などを単独あるいは混合して製造した織物、不織布、合成紙などを該担体に用いることもできる。

このような粒状体、繊維あるいはそれらの混

合物はそのまゝの形で溶液中に分散して用いることが望ましいが、その吸出しを容易にするために、表面積を十分に確保した形で相互に接合し、多孔質成形物とすることも可能である。その場合は特開昭49-53888号、同55-90859号、同57-67860号、同57-101760号、同57-101761号、同57-125847号、同57-197466号、同58-70163号、同59-28571号各公報などに記載されている多孔質反応層の作成法を適用できる。

抗原又は抗体、及び酵素阻害剤の多孔質反応層への固定化は、種々の公知の方法により、該物質を該多孔質反応層の表面に物理的に吸着させるか、化学反応により直接あるいは間接的に結合させることにより達成される。その際、該物質の該特定成分に対する特異的結合性が失われないように留意する必要がある、例えば石川栄治、河合忠、宮井滋編「酵素免疫測定法（第2版）」（医学書院、1982年刊）や千

畑一郎、土佐哲也、松尾雄志著「実験と応用アフィニティクロマトグラフィー」（講談社、1976年刊）に記載されている方法を、好ましい方法の例として挙げることができる。

ここで該抗原又は抗体と該酵素阻害剤は固定部位を分けて担体に固定する必要がある。

固定部位を分けるとは、該抗原又は抗体に結合している標識物の酵素の大部分が該酵素阻害剤により阻害を受けない程度に該抗原又は抗体の担体上の固定部分と、該酵素阻害剤の固定部分が分離されていることを意味する。したがって、同一の担体上において両物質の固定部分が分離されている場合は言うまでもなく、両物質が別々の担体に固定されている場合も含まれる。

また、該特定成分と特異的に結合し得る物質を固定化した後に、必要に応じて免疫反応における非特異的反応を排除する目的で、固定すべき特異的反応に関与しないタンパク質を担持することが可能である。それらの代表的な例としては、哺乳動物の正常血清タンパク質、アルブ

ミン、ゼラテン及びその分解物等が挙げられる。

本発明の特徴は、ここで用いられる、「該特定成分と免疫学的に結合する抗原又は抗体」、及び「該酵素阻害剤」の固定化量に關する。本発明者らは検討を重ねた結果この固定化量が分析素子の性能に極めて大きな影響を与えることを見出した。

すなわち、該抗原又は抗体の固定化量が不足していると流体試料中の特定成分及び標識物が該抗原又は抗体と充分結合せず、また逆に該抗原又は抗体の固定化量が過剰である場合は該特定成分の量にかかわらず該標識物のほゞ一定量が該抗原又は抗体に結合する現象が起き、どちらも満足な検数値を与えない。

また、該酵素阻害剤の固定化量が不足していると、「該抗原又は抗体」、及び「該酵素阻害剤」と結合せず分析素子中の流体試料中に残存する該標識物が増加することにより信号のバックグラウンドが増大する。逆に該酵素阻害剤の固定化量が過剰であると該抗原又は抗体と結合

する該標識物が極めて少なくなり、いずれの場合も測定が困難となる。

そこで、該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の好ましい固定化量について、本発明者らは検討を重ねたところ、次の事実が見出された。すなわち、該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の好ましい固定化量は、該標識物の量、該標識物と該抗原又は抗体のアフィニティー、該標識物と該酵素阻害剤のアフィニティー、該特定成分と該抗原又は抗体のアフィニティー、該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の担体への固定化方法、等の要因により変動する。

また、該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤は生体由来の物質を用いる場合が多く、こうした場合該物質の完全な純品を入手するのは事実上不可能であり、またロットによる純度のバラツキも避け得ない。このような場合、これらの物質の好ましい固定化量を質量やモル数など物理的な単位で規定するのは無意味であり、むしろ該物質の反応性などを単位として規定されるべきで

ある。該抗原又は抗体と結合する該標識物が極めて少なくなり、いずれの場合も、測定が困難となるからである。

特に、該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤に結合していない該標識物は、信号の測定の際のバックグラウンドとなるので、少ない方が好ましいと予想されるが、本発明者らは検討を重ねた結果、この該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤に結合していない該標識物が、標識物の総量の0.1%未満である場合は検量線の形状に好ましくない影響を与えることを発見した。

すなわち、このような場合は、いわゆるS字状曲線型の検量線の曲がり方がきつくなり、測定可能範囲が非常に狭くなる。またこのような条件においては該抗原又は抗体、若しくは該酵素阻害剤の固定化量若しくは活性のわずかな変動によつて、検量線が大きく変動するため、安定な検量線を与える該固定化物の量産が著しく困難になる。これは全く予想できない驚嘆すべき結果であつた。

ある。

本発明者らはこうした多数複雑な要因により変動する該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の好ましい固定化量について明確かつ簡単な基準を見出すべく、更に努力を重ねた結果、本発明を完成するに至つたのである。

すなわち、該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の好ましい固定化量は既に既述したように規定される。

該標識物の総量のうち、5~70%、好ましくは5~50%、更に好ましくは10~25%が該抗原又は抗体と結合しているのが必要である理由は、この数値より不足又は逆に過剰のいずれの場合にも、満足な検量線を与えないからである。

また該標識物の総量のうち、0.1~10%、好ましくは0.1~5%が、該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤と結合しないフリーの状態とするのは、10%を超えると信号のバックグラウンドが増大し、逆に0.1%未満となると、該抗

更に、本発明について詳説する。

該特定成分を実質上含有しない流体試料とは、該流体試料から特定成分をアフィニティークロマトグラフィー等で完全に除去したものが好ましいが、該流体試料中に含まれる特定成分が本発明の実施者が意図する目的に対して無視しうる量であることが確認されておれば充分であり、場合によつては蒸留水、生理食塩水、特定成分を含まない適当なタンパク溶液などで代用することも可能である。

所定の分析操作とは、実施を意図する標識物において、該流体試料の一定量と該標識物の一定量と該固定化物を所定の時間、所定の温度でインキュベートすることを意味する。

彼は、水溶液中においてこれら三者が共存している時間が存在すれば良く、添加順序等は何ら制限を受けない。

また、該水溶液としては該流体試料をそのまま用いても良く、各抽の緩衝液を用いて、その中に該流体試料の一定量を添加する態様も可能

である。

緩衝液は、他の極性溶媒（アルコール、エーテルなど）を含有していてもよく、これらの量は20重量%以下である。緩衝液のpHは5~10の範囲であり、好ましくは6~8.5の範囲である。所望のpHを達成し、測定中にこのpHを維持する各種の緩衝剤の例には、ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸塩、トリス、バルビタール、グッド緩衝剤などがある。

測定温度は通常4~45℃で行うが、好ましくは15~45℃である。

酵素の活性測定は、その酵素の特性に応じて、公知の活性測定法を利用すれば良く、使用する基質の種類により、発色、発光、蛍光等の信号を1回（エンドアッセイ法）あるいは2回以上（レートアッセイ法）測定することにより、その酵素活性を測定できる。

「所定の分析操作を終了した時点」というのは、いわゆるエンドアッセイ法の態様においては該分析素子の信号を測定し終えるべき時刻を

化させた予備試験用担体を数種類作成し、該特定成分を実質上含有しない流体試料を用いて実験に検定することが挙げられる。

この場合、該予備試験用担体及び分析操作は本発明の実施者が意図する態様に基づくべきであるのは言うまでもないが、該標識物と該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の結合反応に実質的に影響を与えない範囲において該検定が容易に行えるよう変更を加えることができる。

該検定の方法は標識の種類により、細かい点で若干異なる場合があるが、当業者は、本発明の実施例を参考に、該検定を容易に行うことができる。

また、数種類の条件について検定を行えば、前述の該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の過不足によつて起きる現象についての記載を参考に、本発明で設定した固定化量の具体的な量を決定することも極めて容易なことである。

#### 〔実施例〕

以下、本発明を実施例によつて更に具体的に

意味し、レートアッセイ法の態様においては最終の信号測定を終えるべき時刻を意味する。

該標識物の総量は、実施者が意図する測定範囲に応じて、一定量を設定するべきものであり、通常流体試料中にある特定成分の量は、症例に応じて判つているので、意図する測定下限値域における流体試料の一定量中の該特定成分の絶対量の10~20倍となるように設定するのが好適である。

以上の条件により設定される該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤量を具体的に知るには各種の方法がある。

該担体に固定化された状態における該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤と該標識物のアフィニティーが結合反応の平衡定数等、定量的な形で判明している場合は、シミュレーション等の方法により好ましい固定化量を知ることができる。しかし、より簡便かつ確実な手段としては、好ましいと予想される範囲で、あらかじめ該抗原又は抗体、及び該酵素阻害剤の固定化量を変

更にするが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

##### (I) 固定化物の作成

ヤギ抗ヒトIgGを0.05M pH 9.6炭酸・重炭酸緩衝液に10μg/mlの濃度で溶解し、平均粒径21μmのポリ（ステレン-コ-ロ-ブチルメタクリレート-コ-グリシジルアクリレート）〔75/15/10〕の高分子重合体粒子を加えて4℃で一晩かくはんした。粒子を生懸食塩水で洗浄後牛血清アルブミン（BBA）200μg/mlを含む同様の緩衝液に入れて4℃で一晩放置し、生懸食塩水で更に洗浄、粒子Aとした。

また、同様の高分子重合体粒子をBBA溶液のみで処理、洗浄し、粒子Bとした。

次に、セファデックスG-25（ファルマシア社製）22gを40mlの25Mリン酸カリウム緩衝液（pH 12.1）に入れ、5~10℃に冷却かくはんしながら20mlの異化シア

ン溶液（約0.05g/ml）を加え、そのまま10分間かくはん後、洗浄した。この処理済セファデックス粒子と0-ジアニシジン（pH9.2、貯所4℃において10分間反応させた後1M・トリス溶液で処理した後水洗し、粒子Cとした。

更に、セファデックス0-25を水洗したのみのものを粒子Dとし、粒子A～Dを、粒子A+粒子B及び粒子C+粒子Dが一定となるように種々の比率で混合し、固定化物a～eとした。

## (2) 固定化物の予備試験

0.015g過酸化水素含有50mMクエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）に0-フェニレンジアミンを25mg/mlの濃度で溶解し発色試薬液とする。

2gBSA含有50mMリン酸緩衝液を480μlずつ試験管に分注し、各々に(1)で作成した固定化物を120μl加える。

各試験管に西洋ワサビペルオキシダーゼ液

を加えた数をBとした。

以上の操作を固定化物(a)～(e)について各々行い、それぞれについて $\frac{A}{B} \times 100$  (g) 及び $\frac{\Sigma}{B} \times 100$  (g) を比較すると次の表1のようになった。

表 1

固定化物	$\frac{A}{B} \times 100$	$\frac{\Sigma}{B} \times 100$	備 考
a	2	23	本発明の固定化物
b	0.02	19	比較例
c	18	15	"
d	0.6	82	"
e	4	2	"

## (3) 検量線の確認

2gBSA含有50mMリン酸緩衝液480μl、(1)で作成した固定化物120μl、及び標識ヒトIgG溶液10μlを試験管に分注し、種々の濃度のヒトIgG溶液各10μlを加え、20分間室温放置後、発色試薬液500μlを加え、37℃20分間インキュベートして、その後1.5N硫酸2mlを加え、試薬ブランクにより

標ヒトIgG溶液10μl及び蒸留水10μlを加え、20分間室温放置した後、更に緩衝液500μlを加え20分間37℃でインキュベートして、遠心分離により固定化物と上澄液を分離し、該固定化物は0.1gポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート溶液で洗浄した。

該上澄液500μlを前述の発色試薬液500μlに加え37℃20分間インキュベート後1.5N硫酸2mlを加え、試薬ブランクにより492nmの吸光度を測定、2を乗じた値をCとした。

また洗浄後の該固定化物金板と該発色試薬液500μl、及び緩衝液500μlを同様にインキュベートし、1.5N硫酸を加え、吸光度を測定、その値をDとした。

更に前述の標識ヒトIgG溶液を50倍に希釈し、その10μl、蒸留水10μl、該発色試薬液500μl及び緩衝液480μlを混合し、同様の操作を行い、得られた吸光度の値に50

492nmの吸光度を測定、検量線を作成した。

以上の操作を該固定化物a～eについて行つたところ、第1図に示すような結果となつた。

すなわち第1図は、本発明方法の実施例及び比較例の検量線をヒトIgG濃度（mg/ml、横軸）と吸光度（縦軸）との関係で示したグラフであり、aが本発明の実施例である。

第1図から明らかなように、c、d、eは濃度差による吸光度変化がなだらかであり、bは高濃度のものが判定できない。結局、aの本発明の検量線が有効である。

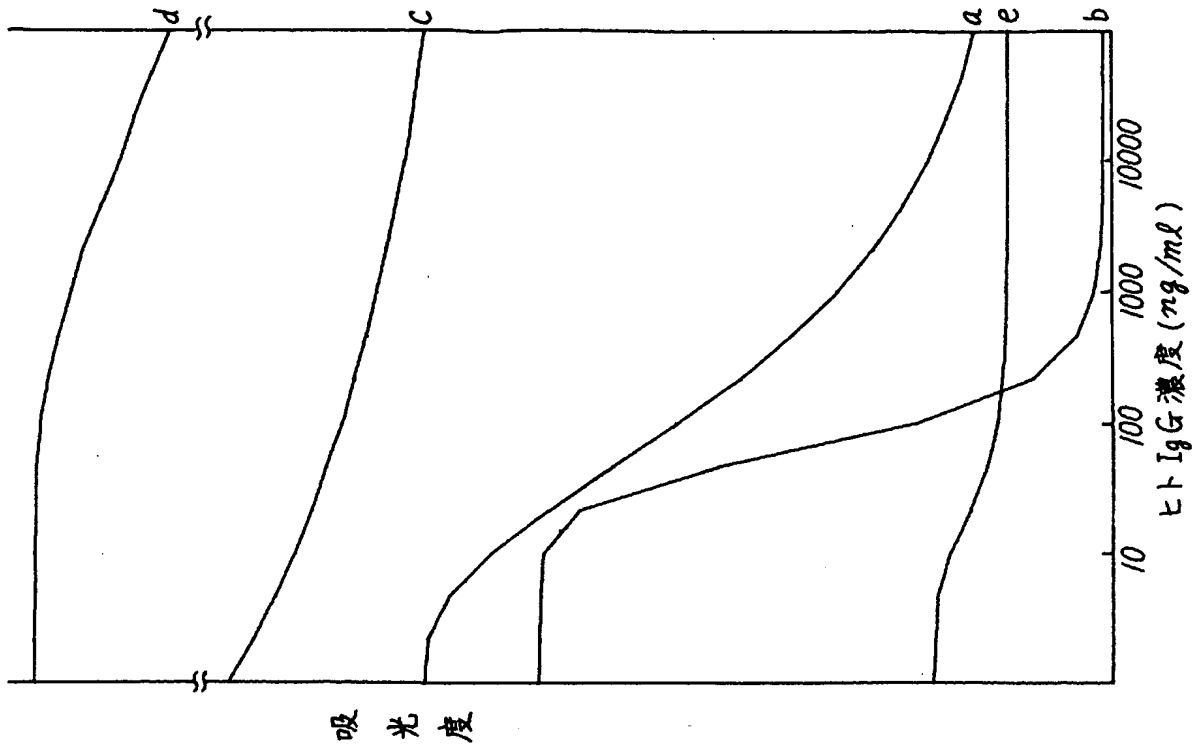
## 〔発明の効果〕

以上説明したように、本発明方法によれば、実施者の意図する該特定成分の濃度範囲において安定した検量線が与えられ、操作が簡単かつ汎用性のある分析が可能となる。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明方法の実施例及び比較例における検量線を、ヒトIgG濃度と吸光度の関係で示したグラフである。

第一図



手続補正書 (自発)

2 補正の内容

昭和61年5月23日

明細書の発明の詳細な説明の欄を下記のとおり補正する。

特許庁長官 宇賀道郎 殿

(1) 明細書第26頁7行の「ミモシン」の次に改行して、「5-アミノイソフタル酸」を加える。

1 事件の表示 昭和61年特許願第91297号

2 発明の名称 特定成分の分析方法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都新宿区西新宿1丁目26番2号

名称 (127) 小西大写真工業株式会社

代表者 井手恵生

4 代理人

〒105 東京都港区西新橋3丁目15番8号

西新橋中央ビル502号 電話(437)-3467

氏名 弁護士(7850) 中本 宏

(ほか2名)

5 補正命令の日付 自発補正

6 補正の対象

(1) 明細書の発明の詳細な説明の欄